

C U S I,
ein säurestabiler, niedermolekularer Proteaseninhibitor
im Cervixmucus; zyklusabhängiges Verhalten,
Beziehungen zu anderen Inhibitoren
und klinische Bedeutung

Jörg Michael Gerstung

1978

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 · Corneliusstraße 21 · Tel.: 268177



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0082

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Bio-
chemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München
Leitung: Prof. Dr. Hans Fritz

und der I. Frauenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Josef Zander

C U S I ,

ein säurestabiler, niedermolekularer Proteaseninhibitor im
Cervixmucus; zyklusabhängiges Verhalten, Beziehungen zu ande-
ren Inhibitoren und klinische Bedeutung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jörg Michael Gerstung

aus
Grünwald

Jahr
1 9 7 8

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Fritz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Zander

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 1978



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	
Cytologie der Cervix uteri	4
Cervixmucus, Überblick	4
Proteine im Cervixmucus und deren Nachweis	5
Die niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren	6
Prinzip der Radialen Immunodiffusion	8
Materialien	8
Experimentelle Methode	
Entnahme des Mucus	9
Herstellung der Agarplatten	9
Verarbeitung des Mucus	10
Auswertungsmethode	10
Ergebnisse	11
Diskussion	
Methodische Probleme	12
Das zyklusabhängige Verhalten der untersuchten Proteine	13
Physiologische Bedeutung von CUSI	14
CUSI und andere niedermolekulare, säurestabile Proteaseninhibitoren; klinischer Bezug	14
Abschließende Charakterisierung der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren	15
Zusammenfassung	16
Abbildungen	17
Literaturverzeichnis	21
Lebenslauf	26

Einleitung

Cytologie der Cervix uteri

Der Bereich der Cervix uteri hat sich zu einem wichtigen Forschungsgebiet entwickelt. Die Cervix ist bei einer Nullipara ca. 2,5 - 3cm lang, bei etwas geringerem Durchmesser. Bei einer Para bestehen größere Variationen. Der Cervixkanal hat in seinem mittleren Drittel den größten Durchmesser (ca. 6 - 8 mm)¹². Er ist von größeren Längsfalten durchzogen, die von kleineren, schrägaufsteigenden Falten ausgehen. Smout und Jacoby bezeichneten das als Arbor vitae uterina⁴⁰. Das Epithel des Cervixkanals besteht aus verschiedenen Typen sekretorischer Zellen und Zellen mit Flimmerhaaren. Die Zellen ohne Flimmerhaare werden als zylindrisch, keulenförmig oder keilförmig beschrieben und enthalten zum Teil apikal liegende PAS-positive Granula oder schaumartiges Sekretionsmaterial. Die Zellen sezernieren apokrin⁷. Die früher als "Cervixdrüsen" beschriebenen Strukturen des Cervixkanals sind keine echten Drüsen, sondern verzweigte Krypten, die mit dem gleichen Epithel ausgekleidet sind wie seine Oberfläche¹².

Cervixmucus, Überblick

Die unterschiedlichen Sekrete der verschiedenartigen Zellgruppen bilden ein Gemisch das einen Bestandteil des Cervixmucus darstellt. Odeblad spricht in diesem Zusammenhang von einem "Mosaikartigen Muster"²¹. Außer den lokalen Zellsekreten enthält der Mucus Stoffe, die das Cervixlumen durch Transsudation erreichen, Sekrete des oberen Genitaltraktes, sowie Leukozyten und anderen Zellelemente³³. Die täglich produzierte Mucushmenge bei einer geschlechtsreifen Frau liegt zwischen 20 und 700 mg¹⁸. Im Verlauf des weiblichen Zyklus treten vielfältige Änderungen in der Zusammensetzung und den Eigenschaften des Mucus auf³³. Parameter für diese Veränderungen sind u. a. die Menge, der Zellgehalt und die Viskosität des Cervixmucus. Die Viskositätsveränderungen werden durch Änderungen im Vernetzungszustand von Makromolekülen bedingt. Diese stellen Glycoproteide mit ca. 80% Kohlenhydratanteilen und ca. 20% Aminosäurereste dar. In

ihrer Zusammensetzung fällt eine außerordentliche Vielfalt auf, wie sie im Gewebe höherer Tiere sonst nicht gefunden wird². Sie bilden eine "tricotähnliche molekulare Gelstruktur"²⁰, deren Zwischenräume mit Wasser (92 - 98%) und darin gelöste Stoffe gefüllt sind. Gelöste Substanzen können frei diffundieren. Die gelösten Stoffe bestehen neben anorganischen Salzen (1%) aus Glucose, Maltose, Mannose, Aminosäuren und Proteinen, die z. T. Enzyme darstellen¹⁸.

Proteine im Cervixmucus und deren Nachweis

Zur Untersuchung der Proteine im Cervixmucus wurden anfangs verschiedene elektrophoretische Methoden angewandt. Spencer, Sunseri und Sunseri verwendeten als erste die Papierelektrophorese⁴¹. Sie fanden eine nichtwandernde mucoide Fraktion; weiter identifizierten sie Albumin und gamma-Globulin und fanden einige Fraktionen im alpha- und beta- Globulinbereich. Moghissi und Neuhaus wiesen mittels Immunelektrophorese Albumin, Transferrin, gamma-Globulin, sowie 3 alpha₂- und 4 beta- Banden nach¹⁹. Schumacher, Strauß und Wied führten zusätzlich dazu den immunelektrophoretischen Nachweis von alpha₁-Antitrypsin und Präalbumin³⁶. Sie fanden zwar, wenn klinisch ein lokalentzündlicher Vorgang vorlag, eine Verbreiterung und Vermehrung der Präzipitationslinien, jedoch war mit dieser Methode eine quantitative Aussage über Proteinkonzentrationen und ihre möglicherweise zyklusabhängenden Schwankungen nicht möglich. Moghissi untersuchte unter Verwendung der Agarelektrophorese quantitative Veränderungen der Albumin- und Globulinfraktion im Verhältnis zur nichtwandernden mucoiden Fraktion¹⁷. Er beschreibt einen deutlichen Anstieg der mucoiden Fraktion verbunden mit einem Abfall der Albuminkonzentration zum Ovulationstermin. Diese Veränderungen bilden sich nach der Ovulation wieder zurück. Eine signifikante Änderung in der Globulinkonzentration wurde nicht gefunden.

Bei all diesen Untersuchungen ergaben sich immer wieder methodische Probleme, die durch die Viskosität und Inhomogenität des Mucus und besonders durch seine geringe Menge verursacht wurden. Ein großer Fortschritt wurde hier mit der Einführung der radialen Immunodiffusion gemacht^{14, 15}. Schumacher untersuchte mit dieser

Methode die im Cervixmucus nachweisbaren Proteine auf quantitative Veränderungen im Zyklusverlauf. 1970 zeigte er, daß die Konzentration von Albumin, α_1 -Antitrypsin und Muramidase im Mucus vor dem Ovulationstermin stark abfällt, dort einen Tiefpunkt erreicht und dann wieder steil ansteigt. Ein Vergleich mit Werten aus Zyklen unter oralen Antikonzeptiva zeigt dort einen viel flacheren, schüsselförmigen Kurvenverlauf ohne eindeutiges Minimum³². Auch alle anderen untersuchten Proteine zeigten einen ähnlichen, zyklusabhängigen Verlauf. Neben den Serumproteinen finden sich lokal produzierte Proteine im Mucus. So wurde Lactoferrin im Mucus aber nicht im Serum nachgewiesen¹⁶, Muramidase³⁵ und Amylase³⁰ wurden im Mucus in höherer Konzentration als im Serum gefunden. Man nimmt sowohl eine lokale Antikörperproduktion wie auch eine Sekretion an, da einerseits das IgG/IgA- Verhältnis prä- und postmenstruell wie im Serum 5:1 beträgt, andererseits aber zum Ovulationstermin auf 2:1 absinkt³³. Außerdem wurden Antikörper gegen Escherichia coli und Candida albicans im Mucus aber nicht im Serum gefunden²³. Die alkalische Phosphatase im Mucus liegt nach Smith al. unter Östrogeneinfluß in ihrer Konzentration niedrig und steigt unter Progesteroneinfluß an³⁹. Man nimmt an, daß das Enzym teilweise lokalen Ursprungs ist. Von den Cervixkrypten wird ein hitzestabiler Fibrinolyseaktivator sezerniert^{1, 44}. Zu der Gruppe der Enzyminhibitoren gehört das α_1 -Antitrypsin. Es ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 45000³⁴. Es hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Plasmin und Kallikrein⁸. Zwei weitere im Mucus gefundene Inhibitoren, α_1 -Antichymotrypsin und Inter- α -Trypsininhibitor, zeigen ebenfalls die bereits beschriebene Zyklusabhängigkeit³³.

Die niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren

1974 wurde von Wallner und Fritz⁴² ein weiterer Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitor im Mucus untersucht. Er ist säurestabil. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 11500. Er findet sich frei und als Enzym-Inhibitor-Komplex im Sekret. Auf Acrosin hat er keine Hemmwirkung. Auffallend ist eine starke Hemmung der Caseinhydrolyse durch neutrale Leukozytenproteasen. Leukozyten sind zeitweise in großer Zahl im Mucus zu finden, insbesondere bei entzündlichen Prozessen und postcoital. Es wurden sowohl im Nasenrachenraum⁹ und den

Bronchien¹¹, als auch im Seminalplasma²⁷ ähnliche Inhibitoren gefunden. Bereits 1965 wies Maendle⁶ Trypsininhibitoren in Geschlechtsdrüsen von Säugetieren nach. Die Inhibitoren konnten 1971 in zwei Fraktionen aufgeteilt werden³. Fraktion I hatte ein Molekulargewicht von ca. 11500, Fraktion II ca. 4000. Daneben bestanden Unterschiede in ihrem Hemmspektrum. So war, im Gegensatz zu Fraktion II, eine Hemmung von Acrosin durch Fraktion I nicht festzustellen⁴. Schiessler²⁷ isolierte die HUSI-I und HUSI-II benannten Inhibitorfraktionen aus menschlichen Seminalplasma. Er bestimmte auch in etwa die Aminosäurezusammensetzung von HUSI-I. Dieser ist säurestabil und hat ein Molekulargewicht von 11000. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 9. Er hat mit dem säurestabilen, niedermolekularen Proteaseninhibitor im Cervicalmucus ein gemeinsames Hemmspektrum. Zusätzlich wurde von Schiessler²⁹ noch eine starke Hemmwirkung des HUSI-I auf menschliche Elastase und Cathepsin G aus Leukozytengranulas gezeigt. Cathepsin G wurde auch als Kininase identifiziert⁵. Die Kininfreisetzung spielt ja beim Entzündungsprozeß eine wesentliche Rolle. Die genannten Leukoproteasen werden im Blut durch α_1 -Antitrypsin und anderen Inhibitoren inaktiviert. Im Sekret des Genitaltraktes ist die Konzentration dieser Inhibitoren für eine effektive Hemmwirkung zu gering. Schiessler postuliert deshalb für HUSI-I im männlichen Genitaltrakt eine ähnliche Schutzfunktion, wie sie im Cervixbereich der dort gefundene verwandte Inhibitor vermutlich erfüllt und nennt den Seminalinhibitor daher jetzt Anti-Leukoprotease²⁹. Diese Anti-Leukoprotease und der säurestabile Inhibitor sind also im Molekulargewicht, im Verhalten im sauren Medium und im Hemmspektrum identisch. Zusätzlich wurde zwischen ihnen immunologische Kreuzreaktionen nachgewiesen²⁷.

Prinzip der Radialen Immunodiffusion³¹

Die Methode der Radialen Immunodiffusion beruht auf der Ausbreitung löslicher Antigene in einem Agar-Medium, in dem Antikörper enthalten sind.

Mucus wird dazu in ein standardisiertes Loch im Agar eingebracht. Die großen Glykoproteinanteile bleiben hier liegen, die löslichen Proteinbestandteile diffundieren radial in den Agar. Es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die als weißliche Immunopräzipitate sichtbar werden. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit hängt von der Gelstruktur der Molekülgröße und Konzentration der diffundierenden Komponente und der Temperatur ab. Die endgültige Größe des Präzipitationsrings ist ein Maß für die Konzentration des untersuchten Proteins im Mucus.

Materialien

Arbeitstisch (nivellierbar), Objektträger, Kunststoffträger und -behälter, Stanzgerät, sowie Agar Noble von der Firma CAMAG, Berlin

Stanzplatte, Stanzzylinder ($\varnothing$ 1,5 mm) und Saugpipette von Dr. Schill, Dermatologische Klinik der Universität München

Standard-Humanserum, Anti-Albumin-Serum, Anti- α_1 -Antitrypsin-Serum, Anti- α_1 -Antichymotrypsin-Serum, Anti-Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Serum der Behringwerke AG, Marburg

Anti-HUSI-I-Substanz aus dem Labor Prof. Dr. Fritz, München

Experimentelle Methode

Entnahme des Mucus

Die Versuchspersonen unterzogen sich zuerst einer gynäkologischen Untersuchung, vorallem um eine etwaige Cervicitis auszuschließen. Es wurde das Ende der nächsten Menstruation abgewartet. Dann entnahmen wir unter Kontrolle der Aufwachtemperaturkurve und des Karyopyknoseindexes einen Zyklus lang Mucusproben im Abstand von drei bis sechs Tagen. Die Mucusproben wurden (nach der Methode von Dr. Wallner, I. Universitätsfrauenklinik, München) mit einer, auf eine Spritze aufgesetzten, Knopfsonde mit Lumen angesaugt. (Diese Knopfsonden werden auch als Führungsgerät beim Pudendus-Block verwendet). Besonders in der post- und prämenstruellen Phase gestaltet sich die Entnahme aufgrund der hohen Viskosität und der geringen Menge des Mucus oft schwierig. Auch waren Blutbeimengungen nicht völlig zu vermeiden. Die gewonnen Proben wurden in Eppendorfhütchen gefüllt und sofort bis zur weiteren Verwendung bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Herstellung der Agarplatten

Die Verarbeitung des Materials wurde auf einem planen Spezialtisch aus Metall vorgenommen. Der unter Kontrolle mit einer Wasserwaage genau horizontal eingestellt wurde. Auf flache Kunststoffträger wurden jeweils drei Objektträger aufgelegt. Die Fugen zwischen den Objektträgern und der Kunststoffunterlage wurden mit neutralen Agar versiegelt. Die Herstellung diese 1%igen Agars erfolgt durch zwanzigminütiges Kochen von Agar Noble in 1/15molaren Sörensen-Puffer. Zur Verhinderung von späterem mikrobiellen Wachstum gaben wir je 100 ml Agar 1 ml 1% Merthiolatlösung zu. Das jeweilige Antiserum wurde frisch hergestelltem Agar bei einer Temperatur von $50 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugesetzt. Die Verdünnung des Antiserums im Agar lag dabei zwischen 1:15 und 1:25. Wir verwendeten Anti-Albumin, Anti-alpha₁-Antitrypsin, Anti-alpha₁-Antichymotrypsin und Anti-Inter-alpha-Trypsininhibitor. Als Antikörper für den niedermolekularen Mucosinhibitor wurde HUSI-I-Antikörper benützt. Der heiße antikörperhaltige Agar wurde sofort mit einer Pipette auf die vorbereiteten Träger aufgebracht. Die Agarmenge pro Träger betrug jeweils 11,5 ml. Es wurde bei jedem Auftragen besonders darauf

geachtet, daß die Agaroberfläche völlig plan war. Der Agar gelierte bereits kurz nach dem Auftragen. Zur völligen Verfestigung wurden die Agarplatten jedoch noch für sechs Stunden bei 4 Grad C⁰ in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Verarbeitung des Mucus

Es wurden im Bereich der Objektträger Löcher in den Agar gestanzt. Pro Objektträger wurden 14 Stanzlöcher gesetzt. Dabei benützten wir eine besondere Stanzplatte (von Dr. Schill, Dermatologische Klinik der Universität München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt), die mit besonders kleinen Stanzzylindern (Ø 1,5 mm) bestückt ist. Dadurch genügte für ein Stanzloch 2 Mikroliter Substanz zur Füllung. Der nach dem Stanzvorgang noch im Loch verbliebene Agar wurde mittels Wasserstrahlpumpe mit einem auf die Lochgröße abgestimmten Vorsatz abgesaugt. Die Füllung der Löcher erfolgte mit über der Flamme kapillarisierten Pasteur-Pipetten. Auf jeder Agarplatte wurden 4 Löcher mit einer Standardverdünnungsreihe von Humanserum gefüllt. In die übrigen Löcher wurden die Mucusproben direkt nach dem Auftauen eingebracht. Als Zeichen der Vollfüllung wurde eine Angleichung der Lichtreflexe von Mucus- und Agaroberfläche betrachtet. Mucus besonders visköser Qualität wurde in kleinen Klumpen eingefüllt, wobei Überflüssige Mengen mit einer silikonisierten Schere (nach Dr. Schill) abgetrennt wurden. Daneben wurden Mucusproben 1:1 verdünnt oder vorsichtig 3 - 4 Sekunden lang mit dem Sonifier behandelt und anschließend 20 Minuten ultrazentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde nur der flüssige klare Überstand verwendet. Bei einem Vergleich mit nativ belassenem Mucus aus derselben Probe ergab sich kein eindeutiger Unterschied. Die Agarplatten wurden anschließend wieder in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur für 48 Stunden inkubiert. Danach war das Wachstum der Präzipitationsringe als sicher abgeschlossen anzunehmen.

Auswertungsmethode

An einem Vergrößerungsgerät mit Leuchtschirm wurde der Durchmesser der Ringe abgemessen. Nach rechnerischer Halbierung konnten dann durch Auftragen von r^2 der Präzipitationsringe des Standardhumanser-

ums gegen die bekannten Standardkonzentrationen Standardkurven erstellt werden. Aus den Standardkurven wurden dann die absoluten Konzentrationswerte der untersuchten Mucuspoteine abgelesen. Ihre Konzentrationsveränderungen im Zyklusverlauf wurden parallel zu den Kurven für die Basaltemperatur und den Karyopknoindex graphisch dargestellt.

Ergebnisse

Es wurden an Hand von Cervixmucusproben, die im Verlauf je eines ovulatorischen Zyklus bei sechs verschiedenen Versuchspersonen entnommen wurden, Proteinkonzentrationen ermittelt. Die Konzentration ist dabei dem Radiusquadrat der Immunopräzipitationsringe proportional³¹. Untersucht wurden Konzentrationen von Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Inter- α -Trypsininhibitor und dem, mit der Antileukoprotease (so nennt Schiessler²⁹ neuerdings aufgrund seiner Eigenschaften HUSI-I) kreuzreagierenden, niedermolekularen und säurestabilen Mucusinhibitor⁴³. Es ergab sich in jedem Fall ein eindeutiger Verlauf der ermittelten Kurven. Unabhängig davon waren individuelle Unterschiede der durchschnittlichen Konzentration. Wir stellten die Konzentrationsveränderungen in Relation zu den Basaltemperaturkurven (Abb. 1). Der Ovulationstermin (0) wurde 24 Stunden vor Anstieg der Basaltemperatur angenommen. Die negativen Zahlen geben die Zyklustage vor Ovulation an, die positiven Zahlen die postovulatorischen Zyklustage. Wir kontrollierten auch den Karyopyknoindex im Verlauf der untersuchten Zyklen (Abb. 2). Zu seiner Bestimmung wurden die Zellen aus einem Abstrich der Vaginalschleimhaut unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Karyopknoindex ist definiert durch die Anzahl karyopknotischer Superficialzellen ausgedrückt in Prozent. Es hat ein Maximum zum Zeitpunkt der Ovulation. Abbildung 3 - 7 zeigen die Konzentrationsverläufe der fünf im Cervicmucus untersuchten Proteine. Abgesehen von individuellen Schwankungen zeigen alle Kurven bei erster Betrachtung ein gemeinsames Prinzip. Sie alle erreichen einen Tiefpunkt am angenommenen Ovulationstermin. Präovulatorisch erfolgt von mehr oder weniger hohen Werten aus ein deutlicher Abfall, postovulatorisch zeigt sich ein entsprechender Anstieg der Proteinkonzentrationen.

Die Konzentrationen können jedoch zu den absoluten Mengen lokal produzierter und aus dem Blut sezernierter Proteine nicht in Relation gestellt werden, da ja nicht von einer konstanten Mucusmenge ausgegangen werden kann. Im Gegenteil variiert die Mucusmenge in sehr weiten Grenzen¹⁸. Außerdem scheint der niedermolekulare Mucosinhibitor bei näherer Betrachtung deutlich geringere Konzentrationsschwankungen als die übrigen Proteine zu zeigen. Aus diesen Gründen setzten wir die Konzentrationen von α_1 -Antitrypsin und der Anti-Leukoprotease in Relation zum Konzentrationsverlauf von Albumin (Abb. 8). Es zeigte sich, daß das Verhältnis von α_1 -Antitrypsin zu Albumin im ganzen Zyklusverlauf praktisch konstant ist. Der Quotient aus den Anti-Leukoprotease- und Albuminwerten zeigt einen steilen präovulatorischen Anstieg, ein eindeutiges Maximum zum Zeitpunkt der Ovulation und einen ebenso deutlichen postovulatorischen Abfall.

Diskussion

Methodische Probleme

Die Technik der Radialen Immunodiffusion hat sich als Fortschritt auf dem Gebiet der biochemischen Analyse kleiner Stoffmengen erwiesen. Besonders günstig war die Anwendung dieser Methode bei der Verarbeitung des viskösen Cervixmucus. Schill fand bei seinen Untersuchungen eine experimentelle Fehlergrenze von ein bis zwei Prozent³¹. Der Immunoelktrophorese ist die Immunodiffusion aufgrund ihrer quantitativen Aussagemöglichkeit überlegen³⁸. Vereinzelt waren Blutbeimengungen zu in Menstruationsnähe entnommenen Proben nicht ganz zu vermeiden. Sehr stark blutig tingierte Proben wurden verworfen; kleinerer Beimengungen ergaben keine aus dem erwarteten Rahmen fallende Werte. Außerdem zeigte sich unterschiedliches Verhalten der Proteine ja besonders um die Zyklusmitte. Fehler durch unterschiedliche Konzentration und Aktivität der Antikörper wurden dadurch vermieden, daß wir auf jeder Agarplatte eine Standardreihe mitlaufen ließen. Die Ergebnisse wurden durch kurze Ultrabeschallung und anschließendes Ultrazentrifugieren des Materials nicht beeinflusst. Das weist einerseits darauf hin, daß die gelösten Sub-

stanzen im Mucus frei diffundieren können^{18, 36}, andererseits darauf, daß keine die Fehlergrenze übersteigende Proteindenaturierung auftrat. Durch die Verwendung von Antikörper wurden auch die durch Proteasen gebundenen Inhibitoren nachgewiesen. Die inhibitorische Aktivität ist im Gegensatz dazu häufig erniedrigt, da bei der Aufarbeitung des Materials die vorhandenen Leukozyten leicht zerstört werden. Aus den Leukozytengranulas werden dann Proteasen frei, die mit den Inhibitoren feste Komplexe eingehen²⁶. Als Parameter für die Zyklusphasen haben wir die Basaltemperaturkurve in Verbindung mit dem Karyopyknoseindex als genügend genau angenommen. Bei größerem experimentellen Aufwand wäre jedoch zusätzlich eine Bestimmung der jeweiligen Plasmaspiegel von LH, FSH u. 17-Hydroxyprogesteron günstig³³.

Das zyklusabhängige Verhalten der untersuchten Proteine

Die experimentell gefundenen Werte über das zyklusabhängige Verhalten von Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin und Inter- α -Trypsininhibitor im Mucus zeigen eindeutige Übereinstimmung mit den von anderen Autoren publizierten Ergebnissen^{33, 34, 37}. Ein davon abweichendes Verhalten zeigt nur der niedermolekulare, säurestabile Mucusinhibitor, der jetzt auch, in Analogie zu HUSI, als CUSI bezeichnet wird²⁹.

Es wurde vermutet, daß die Konzentrationsänderungen der Proteine direkt östrogen-bzw.-gestagenbedingt sind³⁸. Man könnte jedoch bei Betrachtung der Ergebnisse auch einfach vermuten, daß die absolute Menge der im Mucus vorhandenen Proteine, außer CUSI, gleich bleibt, und nur ihre Konzentrationen in Abhängigkeit von der Mucumenge zyklisch schwanken. Ein sicherer Nachweis würde allerdings die Messung der täglich produzierten, totalen Mucumenge bei jeder Versuchsperson voraussetzen. Einen Hinweis auf die Abhängigkeit von der Mucumenge geben jedoch die Ergebnisse von Schumacher bei Probanden unter Antikonzeptiva³³. Der flache, schüsselförmige Verlauf der Konzentrationskurven ließe sich zwanglos aus den geringeren Schwankungen der Mucumenge erklären. Es ist in diesem Zusammenhang auch interessant, daß bei Entzündungen der Nase und der Nasennebenhöhlen keine vermehrte Transsudation von Proteinen aus dem Blut gefunden wurden²⁵.

Der lokal produzierte Inhibitor CUSI verhält sich deutlich anders als alle anderen Proteine im Cervixmucus. Wie in Abbildung 8 ersichtlich, steigt seine Konzentration im Verhältnis zur Albuminkonzentration in Richtung auf die Zyklusmitte hin etwa um das Zwanzig- bis Vierzigfache. Die täglich produzierten Mucusemengen liegen nach Moghissi zwischen 20mg und 700mg¹⁸. Das bedeutet also eine maximale Schwankung um das Fünfunddreißigfache. Wir haben nun eine Durchschnittskurve für die zyklusabhängigen CUSI-Konzentrationen unserer sechs Versuchspersonen erstellt (was statistisch natürlich nicht beweiskräftig ist). Es zeigt sich (Abb.9), daß die Werte im Zyklusverlauf höchstens um den Faktor 2 schwanken. Diese Verhältniszahlen geben einen weiteren Hinweis auf eine etwa gleichbleibende Menge der in den Mucus sezernierten Proteine.

Physiologische Bedeutung von CUSI

Aufgrund dieser Überlegungen kann man auch annehmen, daß die Produktion des niedermolekularen Cervixinhibitors fast oder ganz proportional zur Mucusproduktion erfolgt. Damit wäre während des ganzen Zyklus eine etwa gleichbleibende CUSI-Konzentration im Cervixmucus vorhanden. Unter diesen Bedingungen würde ein gleichmäßiger Schutz des Cervixepithels vor der Andauung durch Proteasen gewährleistet werden, da CUSI physiologisch als Inhibitor von Leukozytenproteasen wirkt^{28, 29, 42, 43}. Diese Leukozytenproteasen spielen bei Entzündungen eine wichtige Rolle²⁹. CUSI bildet mit ihnen sehr feste Komplexe. Seine Dissoziationskonstante liegt mit Granulozytenelastase bei $1,30 \times 10^{-9}$, mit Cathepsin G aus Granulozyten bei $1,23 \times 10^{-8}$ ²⁹.

CUSI und andere niedermolekulare, säurestabile Proteaseninhibitoren; klinischer Bezug

Die Dissoziationskonstante entspricht damit fast den Werten, die mit HUSI-I gemessen wurden. CUSI und HUSI-I haben gemeinsam mit einem niedermolekularen Inhibitor im Nasenrachenraum⁹ und in den Bronchien¹¹ dasselbe Hemmspektrum, etwa dasselbe Molekulargewicht und sind säurestabil. Eine Behandlung mit Perchlorsäure pH 0,8 denaturiert sie nicht

Für CUSI und HUSI-I ist eine praktisch identische Aminosäurezusammensetzung nachgewiesen⁴³. Außerdem zeigen HUSI-I, CUSI und der Bronchialinhibitor immunologische Kreuzresistenz²². Bei Hochstraßer wurde die Beziehung der niedermolekularen Inhibitoren im Respirationsstrakt zu Entzündungen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß im Verlauf von akuten Entzündungen der Spiegel des freien Naseninhibitors deutlich abfiel und nach Heilung wieder normale Werte erreichte, wobei anfangs Übernormale Werte auftraten. Als Normalwert ergab sich durch Untersuchung gesunder Personen etwa ein Wert von 18 ImU/mg sezerniertes Protein²⁵. Die Veränderungen wurden als Inhibitorverbrauch durch Komplexbildung mit Leukozytenproteasen und reaktiver Mehrproduktion gedeutet. Bei chronischen Entzündungen war der Inhibitorspiegel dauernd gesenkt²⁵. Die proteolytische Aktivität in pathologischen Nasensekreten ist zu 70% durch isolierten Inhibitor aus normalem Nasensekret hemmbar. Daß diese hemmbare Aktivität aus Leukozyten stammt, zeigen die parallel verlaufenden Hemmkurven von pathologischem Nasensekret und Leukozytenproteasen mit dem isolierten Naseninhibitor¹⁰. Die restliche, nicht hemmbare Aktivität ist auf Bakterienproteasen und Exopeptidasen zurückzuführen⁹. Bei Ozaena läßt sich im Gegensatz zu anderen Rhinopathien kein Anstieg des freien Inhibitors nach Säurebehandlung nachweisen. Hier liegt vermutlich ein Inhibitor-mangel vor²⁴. Ein ähnliches Bild wurde bereits beim chronisch obstruktiven Lungenemphysem bei hereditärem α_1 -Antitrypsinmangel gefunden¹³. Inzwischen wurde an Patienten mit Carvicitis das Verhalten von CUSI untersucht. Der größte Teil des normalerweise freien CUSI wurde dabei an Proteasen gebunden gefunden. Zusätzlich fand sich freie proteolytische Aktivität⁴³. Die Ergebnisse waren den von Hochstraßer gefundenen Veränderungen bei einer starken Entzündung sehr ähnlich.

Abschließende Charakterisierung der niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitoren

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es im männlichen und weiblichen Genitaltrakt, im Nasenrachenraum und in den Bronchien säurestabile, niedermolekulare Enzym-inhibitoren gibt, die vom Aufbau und der Funktion her sehr ähnlich oder identisch sind. Sie hemmen

Trypsin und Chymotrypsin, sind jedoch nicht spezifisch dafür. (Für HUSI-I läßt sich weder ein Lysin- noch ein Argininrest im reaktiven Zentrum nachweisen²⁸.) Physiologischerweise hemmen sie die neutralen Leukozytenproteasen mit Ausnahme der Leukozytenkollagenase (nachgewiesen für HUSI-I²⁹). Aufgrund ihrer Eigenschaften stellen sie vermutlich einen wichtigen Schutz gegen Epithelerosionen im Genital- und Respirationstrakt dar. Sie übernehmen hier die Aufgaben, die im Blut von α_1 -Antitrypsin und anderen Makroproteinen erfüllt werden. Ein Verbrauch oder das Fehlen der Inhibitoren führt zu akuter oder chronischer Schädigung der Schleimhäute. Es ist also physiologisch sinnvoll, daß auch der Inhibitor im Cervixmucus, entgegen den zyklischen Schwankungen anderer Proteine, bei Gesunden in gleichbleibender Konzentration vorhanden ist.

Zusammenfassung

Es wurden die Konzentrationen von Albumin, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Inter- α -Trypsininhibitor und dem säurestabilen, niedermolekularen Inhibitor CUSI im Cervixmucus abhängig vom Zyklusablauf untersucht. Als Methode verwendeten wir die radiale Immunodiffusion. Die Ergebnisse zeigten zyklische Schwankungen der Proteinkonzentrationen im Mucus mit einem Tiefpunkt zum Ovulationstermin. Dies entspricht den Resultaten anderer Autoren. CUSI dagegen zeigt ein abweichendes Verhalten. Seine Produktion scheint sich parallel zur Mucusmenge zu verändern. Er ist während des ganzen Zyklus in nur geringfügig schwankender Konzentration im Mucus nachgewiesen. Dieses Verhalten ist für seine physiologische, lokal entzündungshemmende Wirkung sinnvoll.

Ovulatorische Zyklen

Abb.1

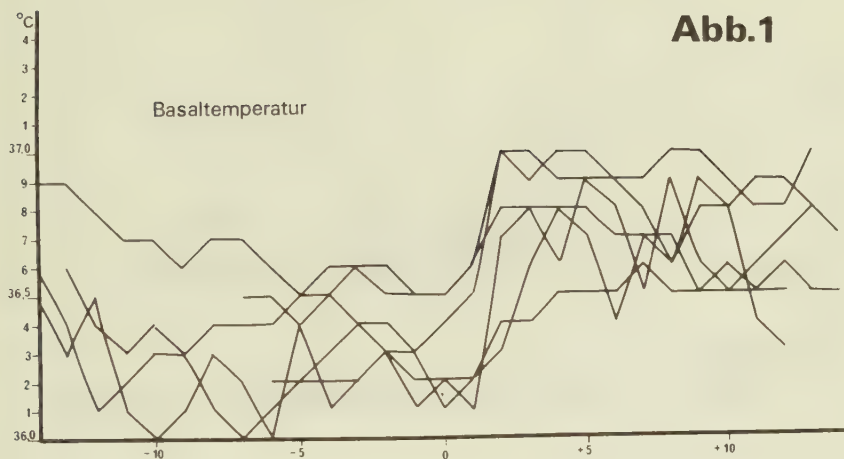
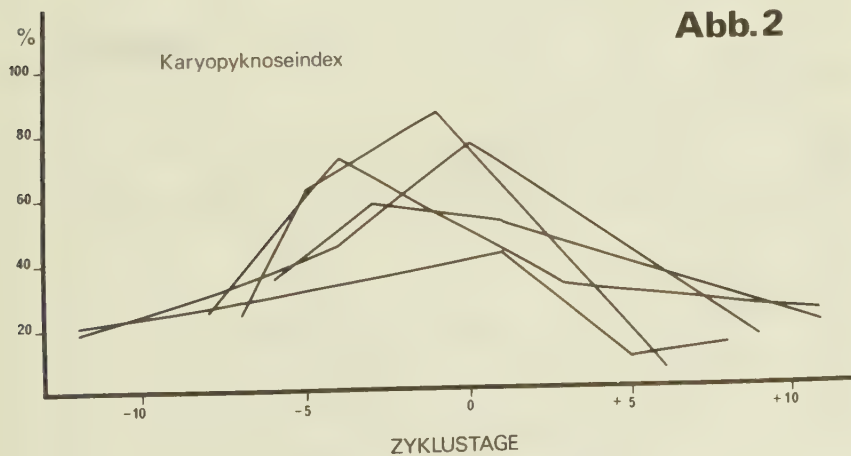
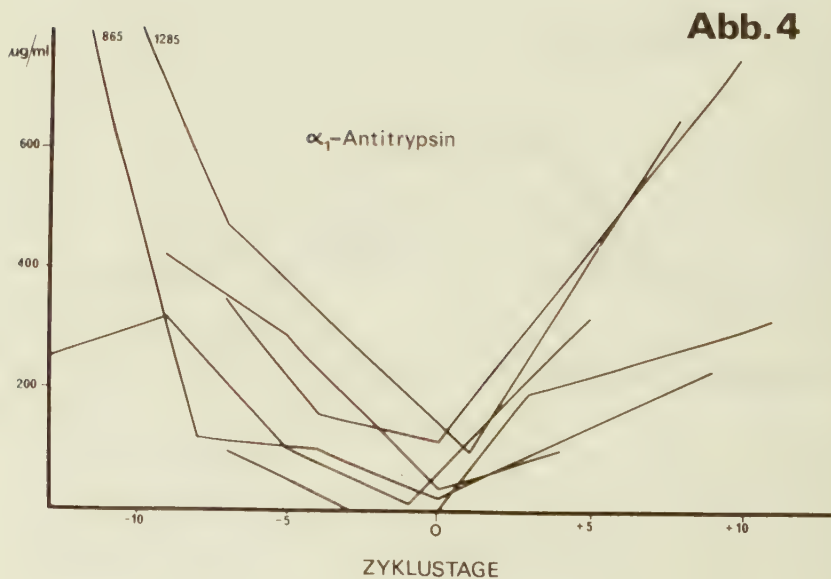
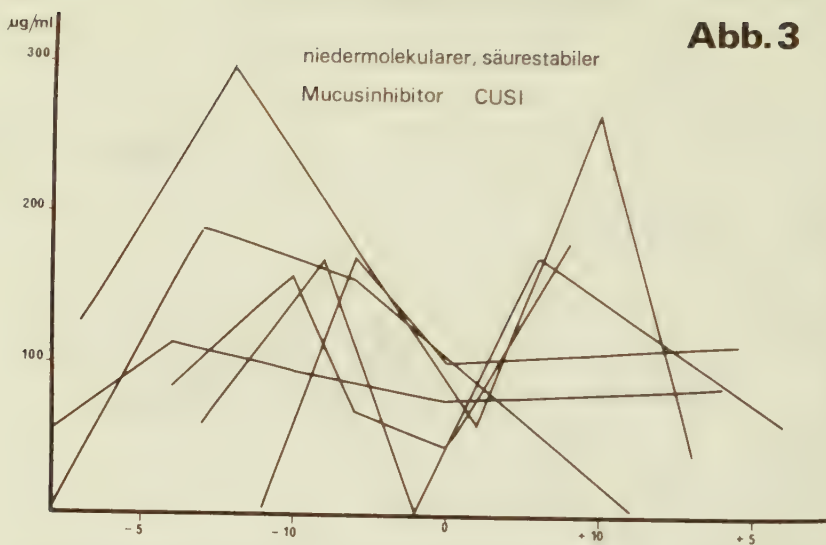


Abb.2





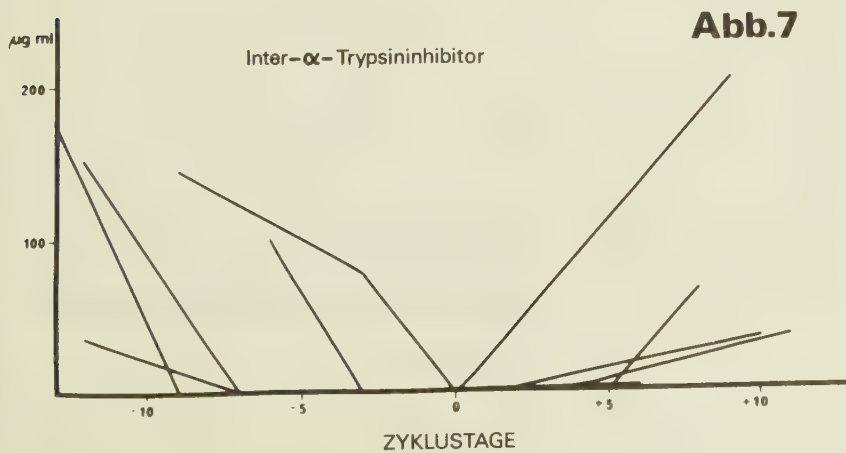
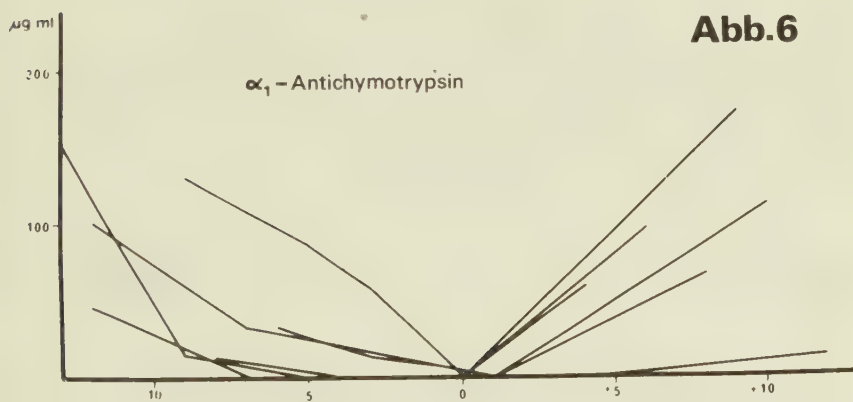
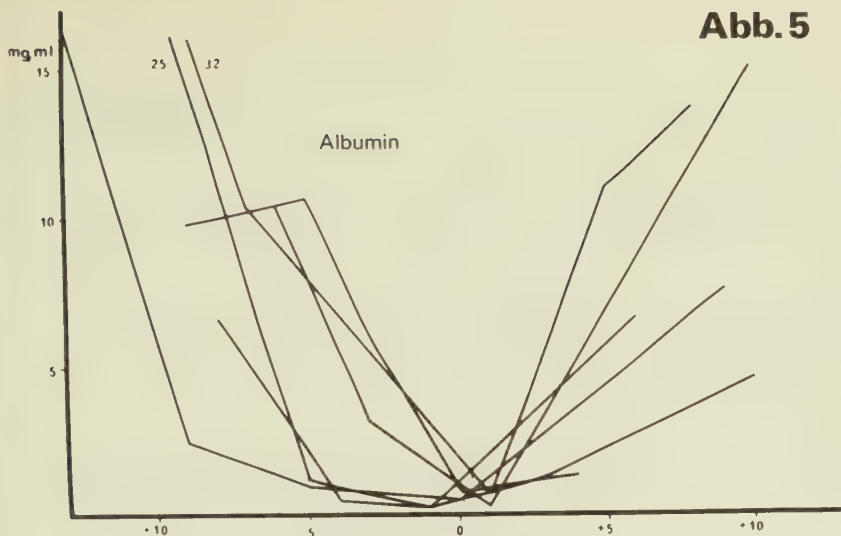
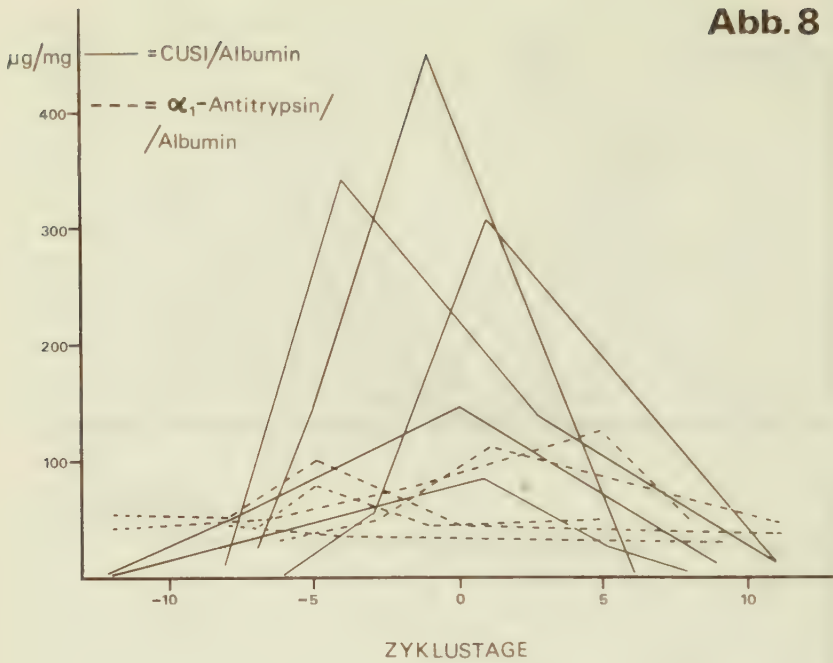
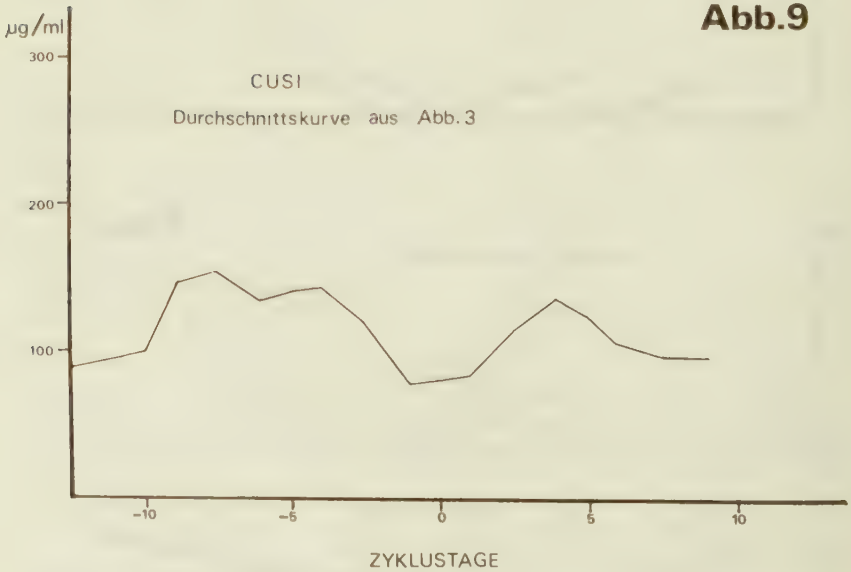


Abb. 8**Abb. 9**

Literaturverzeichnis

- 1 Beller, F.K., Weiss, G., The fibrinolytic system in cervical mucus, 1966, Fertil. Steril., 17, 654
- 2 Doeber, S.A., Moghissi, K.S., Human and bovine cervical mucins, in: The Biology of the Cervix, ed. by R. J. Blandau and K. Moghissi, 1973, The University of Chicago Press, Chicago, London, 125 - 142
- 3 Fink, E., Jaumann, E., Fritz, H., Ingrisch, H., Werle, E., Proteaseninhibitoren im menschlichen Sperma, Isolierung durch Affinitätschromatographie und Hemmverhalten, 1971, Z. physiol. Chem., 352, 1591
- 4 Fritz, H., Förg-Brey, B., Fink, E., Schiessler, H., Jaumann, E., Arnold, M., Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-Proteinase-Inhibitoren, I, Seminale Trypsin-Inhibitoren und Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, 1972, Z. physiol. Chem., 353, 1007
- 5 Geiger, R., Ohlsson, K., Fritz, H., nicht veröffentlichte Ergebnisse
- 6 Haendle, H., Fritz, H., Trautschold, I., Werle, E., Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma, 1965, Z. physiol. Chem., 343, 185
- 7 Hafez, E.S.E., The comparative anatomy of the mammalian cervix, in: The Biology of the Cervix, 1973, 23 - 56
- 8 Heimbürger, N., Protease inhibitors in human serum, in: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, 1970, ed. H. Fritz, H. Tschesche, Berlin: W. de Gruyter

- 9 Hochstraßer, K., Haendle, H., Reichert, R., Werle, E.,
Über Vorkommen und Eigenschaften eines Proteaseninhibitors
im menschlichen Nasensekret, 1971, Z. physiol. Chem., 352, 954
- 10 Hochstraßer, K., Reichert, R., Matzner, M., Werle, E.,
Hemmbarkeit proteolytischer Enzyme in pathologischen Nasensekreten und von Leukozytenproteasen durch den natürlichen Proteaseninhibitor des Nasensekrets,
1972, Z. klin. Chem. u. klin. Biochem., 10, 104
- 11 Hochstraßer, K., Reichert, R., Schwarz, S., Werle, E.,
Isolierung und Charakterisierung eines Proteaseninhibitors
aus menschlichem Bronchialsekret, 1972, Z. physiol. Chem.,
353, 221
- 12 Krantz, K.E., The anatomy of the human cervix, in: The Biology
of the Cervix, 1973, 57 - 69
- 13 Larell, B., Eriksson, S., 1963, Scand. J. Lab. Invest., 15, 529
- 14 Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., Immunochemical
quantitation of antigens by single radial immunodiffusion,
1965, Immunochemistry, 2, 235
- 15 Macini, G., Vaerman, J.-P., Carbonara, A.O., Heremans, J.F.,
A single-radial-diffusion method for the immunological
quantitation of proteins, in: Protides of the Biological
Fluids, 1964 (Vol. 11), Elsevier, Amsterdam, 370 - 373
- 16 Masson, P.L., Heremans, J.F., Férin, J., Clinical importance
of the biochemical changes in the female genital tract,
I, Studies on the proteins of cervical mucus,
1969, Int. J. Fertil., 14, 1
- 17 Moghissi, K.S., Cyclic changes of cervical mucus in normal
and progestintreated women, 1966, Fertil. Steril., 17, 633

- 18 Moghissi, K.S., Sperm migration through the human cervix,
in: The Biology of the Cervix, 1973, 305 - 327
- 19 Moghissi, K.S., Neuhaus, O.W., Composition and properties of
human cervical mucus, II. Immunelectrophoretic studies of
the proteins, 1962, Amer. J. Obstet. Gynec., 83, 149
- 20 Odeblad, E., The functional structure of human cervical
mucus, 1968, Acta. Obstet. Gynec. Scand., 47 (suppl. 1), 58
- 21 Odeblad, E., Types of human cervical secretions,
1969, Acta. Europ. Fertil., 1, 99
- 22 Ohlsson, K., Tegner, H., Fritz, H., Schiessler, H.,
Immunologic similarity between low molecular weight
Trypsin-Chymotrypsin inhibitors from human bronchial secretion
and seminal plasma, 1976, Z. physiol. Chem., 357, 1241
- 23 Parish, W.E., Carron-Brown, J.A., Richards, C.B., The detection
of antibodies to spermatozoa and to blood group antigens
in cervical mucus, 1967, J. Reprod. Fertil., 13, 469
- 24 Reichert, R., Hochstraßer, K., Proteaseninhibitormangel
im Nasensekret des Ozaenakranken,
1972, Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.-u. Kehlk. Heilk., 201, 11
- 25 Reichert, R., Hochstraßer, K., Veränderungen des Proteasen-
inhibitorspiegels im menschlichen Nasensekret im Verlauf
verschiedener Rhinopathien, 1972, Z. Laryng. Rhinol., 51, 73
- 26 Reichert, R., Hochstraßer, K., Werle, E., Nachweis eines
niedermolekularen Proteaseinhibitors in menschlichem
Bronchialsekret, 1972, Z. Laryng. Rhinol., 51, 190

- 27 Schiessler,H., Arnold,M., Fritz,H., Characterization of two proteinase inhibitors from human seminal plasma and spermatozoa, in: Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors", 1974, ed. H. Fritz, H. Tschesche, L.J.Greene, E.Truscheit, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 147 - 155
- 28 Schiessler,H., Arnold,M., Fritz,H., Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma: purification and characterization, in: Protides of the Biological Fluids, 1976, ed. H.Peeters, XXIII. Colloquium, 163 - 169
- 29 Schiessler,H., Arnold,M., Ohlsson,K., Fritz,H., Inhibitors of Acrosin and granulocyte proteinases from human genital tract secretions, 1976, Z. physiol. Chem., 1251
- 30 Schill,W.B., Schumacher,G.F., Radial diffusion in gel for micro determination of enzymes, 1972, Anal. Biochem., 46, 502
- 31 Schill,W.B., Schumacher,G.F.B., Micro radial diffusion in gel, methods for the quantitative assessment of soluble proteins in genital secretions, in: The Biology of the Cervix, 1973, 173 - 200
- 32 Schumacher,G.F.B., Biochemistry of cervical mucus, 1970, b,Fertil. Steril., 21, 697
- 33 Schumacher,G.F.B., Soluble proteins in cervical mucus, in: The Biology of the Cervix, 1973, 201 - 233
- 34 Schumacher,G.F.B., Pearl,M.J., alpha₁-Antitrypsin in cervical mucus, 1968, Fertil. Steril., 19, 91
- 35 Schumacher,G.F.B., Pearl,M.J., Cyclic changes of Muremidase in cervical mucus, 1969, b, J.Reprod. Med., 3, 171

- 36 Schumacher,G.F.B., Strauss,E.K., Wied,G.L., Serum proteins in cervical mucus, 1965, Amer.J.Obstet.Gynec., 91, 1035
- 37 Schumacher,G.F.B., Wied,G.L., Semiquantitative microanalysis of proteins in cervical mucus, in: Proceedings of the Fifth World Congress on Fertility and Sterility, 1967, International congress series no. 133, 713-722, Amsterdam, New York: Exepta Medica Foundation
- 38 Schumacher,G.F.B., Zaneveld,L.J.D., Proteinase inhibitors in human cervical mucus and their in vitro interactions with human Acrosin, in: Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors", 1974, 178 - 186
- 39 Smith,D.C., Hunter,W.B., Spadoni,L.R., Alkaline phosphatase concentration in cervical mucus, 1970, Fertil. Steril., 21 549
- 40 Smout,C.F.V., Jacoby,F., 1953, Gynecological and obstetrical anatomy and functional histology, 3d ed. Baltimore: Williams and Wilkins
- 41 Spencer,B., Sunseri,L.Z., Sunseri,S.G., Electrophoretic examination of human cervical mucus from normal pregnant and carcinomatous patients, 1957, Clin. Chem. Acta., 2, 485
- 42 Wallner,O.,Fritz,H., Characterization of an acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus, 1974, Z. Physiol. Chem., 355, 709
- 43 Wallner,O., Fritz,H., Hochstraßer,K., An acid stable proteinase inhibitor in human cervical mucus, in: Protides of the Biological Fluids, 1975, ed. H.Peeters, Vol. 23, 177 - 182
- 44 Weiss,G., Beller,F.K., Tissue activator of the fibrinolytic enzyme in the female reproductive system, 1969, Obstet. Gynec., 34, 809

Lebenslauf

Ich wurde am 24. 12. 1948 in München geboren.

Meine ersten Kinderjahre verbrachte ich in Trudering am Ostrand von München, bis wir zum Zeitpunkt meines Schuleintritts nach Grünwald umzogen. Ich besuchte die Grünwalder Volksschule und anschließend das Albert-Einstein-Gymnasium, ein neusprachliches Gymnasium in Harlaching. Nach dem Abitur im Jahr 1969 studierte ich 2 Semester Theologie und Germanistik. Erst dann entschloß ich mich zum Studium der Medizin. Am 15. 6. 1976 konnte ich es mit dem Staatsexamen abschließen. Meine MA-Zeit verbrachte ich in der Med. Klinik Innenstadt der Universität München und im Kreiskrankenhaus Vilshofen. Am 28. 10. 1977 erhielt ich die Approbation als Arzt

